

①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Off nl gungsschrift
⑪ DE 3922873 A1

⑳ Aktenzeichen: P 39 22 873.8
㉔ Anmeldetag: 12. 7. 89
㉕ Offenlegungstag: 31. 10. 90

⑤ Int. Cl. 5:
C 12 N 5/24
C 12 N 15/63
C 07 K 15/28
C 12 P 21/00
C 12 P 19/34
A 61 K 39/395
G 01 N 33/53
// (C12N 5/00,
C12R 1:91)

DE 3922873 A1

③① Innere Priorität: ③② ③③ ③①
25.04.89 DE 39 13 568.3

⑦① Anmelder:
Boehringer Mannheim GmbH, 6800 Mannheim, DE

⑦② Erfinder:

Katus, Hugo, Prof. Dr., 6901 Bammental, DE; Borgya, Anneliese, Dipl.-Biol., 8132 Tutzing, DE; Hallermayer, Klaus, Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., 8000 München, DE; Looser, Siegfried, Dr.rer.nat., 8120 Weilheim, DE

⑤④ Spezifische Antikörper gegen Troponin T, ihre Herstellung und Verwendung in einem Reagenz zur Bestimmung von Herzmuskelnekrosen

Ein Immunoassay zur Bestimmung von Herzmuskelnekrosen, unter Verwendung von Antikörpern gegen Troponin T und einem Bindungspartner B für Troponin T oder für den Antikörper, wobei entweder der Antikörper oder der Bindungspartner B mit einer bestimmbaren Gruppe markiert ist. Der gebildete immunologische Komplex, der die bestimmbare Gruppe enthält, wird durch Phasentrennung abgetrennt und die bestimmbare Gruppe in einer der Phasen bestimmt. Außerdem werden monoklonale und polyklonale Antikörper gegen Troponin T beschrieben, mit einer Kreuzreaktivität von weniger als 5% gegenüber Skelettmuskel-Troponin T.

DE 3922873 A1

DE 39 22 873 A1

1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft spezifische Antikörper gegen Herzmuskel-Troponin-T, deren Herstellung und Verwendung in einem immunologischen Reagenz zur Bestimmung von Herzmuskelnekrosen.

Die Myofibrillen des quergestreiften Muskels bestehen aus zwei zusammenwirkenden Proteinfilamenten, den dicken Filamenten mit Myosin als Hauptbestandteil und den dünnen Filamenten, die Actin, Tropomyosin und Troponine enthalten. Troponin ist in den Zellen als regulatives Strukturprotein zu einem Komplex zusammengelagert und besteht aus drei verschiedenen Proteinen:

Troponin C (Mg 18 000) bindet Calciumionen
Troponin I (Mg 24 000) eine actinbindende Untereinheit
Troponin T (Mg 37 000) lagert sich an Tropomyosin an.

Die vergleichbare Nomenklatur hat historische Gründe, da ursprünglich der Komplex als solcher gereinigt und als ein einziges Protein angesehen und mit Troponin bezeichnet wurde. Erst später konnte nachgewiesen werden, daß Troponin in Wirklichkeit aus drei verschiedenen Proteinen besteht. Diese Nomenklatur wurde dann wegen der räumlichen Beziehung der Proteine auf dem dünnen Filament des kontraktilen Apparates und wegen ihrer Kooperation im Rahmen der Regulation der Muskelkontraktion beibehalten. Es handelt sich dabei jedoch um drei verschiedene Proteine, die mit den anderen Proteinen des kontraktilen Apparates, wie Myosin oder Actin, funktionell in Beziehung stehen, aber unterschiedliche Aminosäuresequenzen haben.

Bei lang dauernder schwerer Ischämie bzw. Muskelzellennekrosen gelangt Troponin I in das Blutplasma und stellt somit einen Parameter für derartige Erkrankungen dar, der auch zur Diagnose und Verlaufskontrolle, analog den bekannten "Infarktzyklen" CK, CK-MB, GOT und LDH eingesetzt werden kann.

Es hat sich gezeigt, daß die Bestimmung der CK und CK-MB nicht völlig spezifisch für einen Infarkt und nur 80-90 Stunden nach dem Infarkt im Serum erhöht ist. Auch GOT und LDH sind nicht herzmuskelspezifisch, da bei vielen anderen Erkrankungen ebenfalls erhöhte Werte im Blut gefunden werden.

Der Nachteil einer Bestimmung von kardialen Troponin I ist, daß im Serum normalerweise bereits Konzentrationen von Troponin I in der Höhe von 10 ng/ml auftreten (vgl. B. Cummins, J. Mol. Cell. Card. 19 (1987), 999-1010 und B. Cummins, Clin. Invest. 113 (1987) 1333-1344). Es zeigt sich, daß beim transmuralen Infarkt eine biphasische Serumkonzentration auftritt. Im Mittel war Troponin I von der 4. bis zur 168. Stunde nach Schmerzbeginn bei 37 Patienten mit akutem transmuralen Infarkt erhöht. Ähnliche Ergebnisse wurden im Tiermodell erhalten. Danach ergibt sich als Zeitintervall für die absolute diagnostische Sensitivität für Troponin I die 10.-50. Stunde nach dem Infarktereignis. Somit kann neben der begrenzten Sensitivität auch die klinisch wichtige Verlaufskontrolle über 10 Tage und länger nach dem Infarktereignis mit der Troponin I-Bestimmung nicht erreicht werden.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung lag darin, diese Nachteile zu beseitigen und ein Bestimmungsverfahren zur Verfügung zu stellen, mit dem bei Myokardinfarkten und sonstigen Herzmuskelschädigungen eine

2

Verlaufskontrolle über mindestens 150 Stunden möglich ist.

Diese Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zur Bestimmung von Herzmuskelnekrosen nach dem Prinzip des Immunoassays, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß eine Serum- oder Plasmaprobe mit mindestens einem Antikörper gegen Troponin T und einem Bindepartner B für Troponin T oder für den Antikörper inkubiert wird, wobei entweder der Antikörper gegen Troponin T oder der Bindepartner B mit einer bestimmbaren Gruppe markiert ist, der dabei gebildete immunologische Komplex, der die bestimmbare Gruppe enthält, abgetrennt und die bestimmbare Gruppe in der abgetrennten oder noch verbliebenen Phase als Maß für Troponin T aus der Probe bestimmt wird.

Der Bindepartner B muß an dem Antikörper gegen Troponin T oder an Troponin T binden. B kann beispielsweise ein zweiter Antikörper gegen Troponin T oder humanes oder tierisches Troponin T oder ein Analoges davon, welches von dem Antikörper gebunden wird, sein.

Vorzugsweise wird die Probe mit einem Antikörper gegen Troponin T und einem Konjugat aus einem weiteren Antikörper gegen Troponin T und einer bestimmbaren Gruppe inkubiert, der gebildete immunologische Komplex durch Phasentrennung abgetrennt und die bestimmbare Gruppe in einer der Phasen bestimmt.

Weiter bevorzugt ist es, die Probe mit einem Antikörper gegen Troponin T und einem Konjugat aus Troponin T und einer bestimmbaren Gruppe zu inkubieren, den gebildeten immunologischen Komplex durch Phasentrennung abzutrennen und die bestimmbare Gruppe in einer der Phasen zu bestimmen.

Es hat sich überraschenderweise gezeigt, daß durch einen Troponin T-Immunoassay eine deutlich höhere Sensitivität bei der Bestimmung von Herzmuskelnekrosen (wie z. B. durch Herzinfarkt, Ischämie oder Angina pectoris) als bei der Bestimmung anderer Parameter, wie CK, CK-MB, GOT, LDH oder Troponin I, erhalten wird. Wie die Erfinder festgestellt haben, ist dies dadurch begründet, daß im Gegensatz zu anderen Proteinen des kontraktilen Apparates für Troponin T bis zur Nachweisgrenze des Tests (1 ng/ml) kein Serumspiegel gemessen werden kann.

Dies ist besonders überraschend, da auf Grund der funktionellen Beziehung zwischen den Troponinen für Troponin T ein ähnlicher Serumspiegel wie für Troponin I zu erwarten war. Weiter unterscheidet sich die Serumkonzentrationskurve von Troponin T, beispielsweise beim transmuralen Infarkt, signifikant von der Kurve des Troponin I. Es wird im Gegensatz zu Troponin I anstelle einer zweiphasigen eine dreiphasige Verlaufskurve gefunden, mit der Troponin T im Mittel als erhöht bis zu 300 Stunden nach Schmerzbeginn gefunden wird. Das Zeitintervall absoluter diagnostischer Sensitivität erstreckt sich von der 6. bis zur 195. Stunde. Damit ist das Zeitintervall absoluter diagnostischer Sensitivität nahezu viermal so lang wie es für Troponin I bekannt ist.

Für die erfindungsgemäß immunologische Bestimmungsmethode eignen sich im Prinzip alle gängigen Immunoassays, wie Radioimmunoassay, Enzymimmunoassay, Fluoreszenzimmunoassay usw. Ferner sind sämtliche Verfahrensvarianten, wie kompetitiver Immunoassay, IEMA-Verfahren usw., anwendbar. Zur Bestimmung von Troponin T hat sich als besonders zweckmäßig ein Sandwich-Test erwiesen. Bei diesem Testverfahren wird ein immobilisierter Antikörper gegen Troponin

DE 39 22 873 A1

3

4

nin T und ein Konjugat aus einem Antikörper gegen Troponin T und einer bestimmaren Gruppe verwendet. Die verschiedenen Varianten dieser Testmethode sowie Einzelheiten zur Durchführung dieser Verfahren sind in der Literatur ausführlich beschrieben. Es sind jedoch auch andere immunologische Bestimmungsverfahren unter Verwendung der erfindungsgemäßen Antikörper möglich, so wie sie z. B. in der deutschen Patentanmeldung DE-A 38 34 766 und/oder DE-A 38 22 750 beschrieben sind, möglich.

Unter einem Antikörper im Sinne der Erfindung ist ein kompletter Antikörper, chimärer Antikörper, bivalenter Antikörper oder Fragmente davon zu verstehen. Die verwendeten Antikörper gegen Troponin T können polyklonal oder monoklonal sein. Die Verwendung von monoklonalen Antikörpern ist bevorzugt.

Beim Sandwich-Test als bevorzugte Ausführungsform wird die Probenlösung mit mindestens zwei Antikörpern gegen Troponin T inkubiert. Der erste Antikörper vermittelt dabei die Bindung an die Festphase. Dazu kann dieser Antikörper entweder direkt oder über einen Spacer an die Festphase gebunden sein oder aber in löslicher Form vorliegen und erst nach Durchführung der immunologischen Reaktion immobilisiert werden. Der zweite Antikörper kann entweder direkt mit einer bestimmten Gruppe markiert sein oder über eine funktionelle Bindung an die bestimmare Gruppe gebunden werden. Dazu kann der Antikörper an den einen Partner eines spezifischen Bindungspaares und die bestimmare Gruppe an den anderen Partner des spezifischen Bindungspaares gebunden sein. Bei der Umsetzung entsteht dann ein Komplex, der sowohl den zweiten Antikörper als auch die bestimmare Gruppe enthält. Die Bindung des ersten Antikörpers an den Träger (Immobilisierung) erfolgt nach den dem Fachmann geläufigen Methoden durch adsorptive, chemische Bindung oder durch funktionelle Bindung über ein spezifisches Bindungspaar. In diesem Falle ist ein Partner des Bindungspaares immobilisiert, während der andere Partner chemisch an den Antikörper gebunden ist. Über dieses Bindungspaar kann dann der Antikörper vor oder während der immunologischen Bestimmungsreaktion immobilisiert werden. Beispiele für derartige Bindungspaare sind Biotin-Streptavidin/Avidin, Hapten-Antikörper, Antigen-Antikörper, Zucker-Lectin, Hapten-Bindeprotein.

Eine weitere bevorzugte Testvariante ist der kompetitive Test. Dabei wird ein vor oder während der Bestimmung immobilisierter Antikörper gegen Troponin T und ein Konjugat aus Troponin T und einer bestimmaren Gruppe verwendet.

Als Trägermaterialien zur Immobilisierung der erfindungsgemäßen Antikörper bzw. zur Immobilisierung von Troponin T können Materialien verwendet werden, wie z. B. Röhrchen (tubes), Kunststoffküvetten, Mikrotiterplatten, Kugeln (beads) oder Mikrocarrier aus Kunststoffen, wie Polystyrol, Vinylpolymere, Polypropylen, Polycarbonat, Polysaccharide, Silikone, Gummi oder behandeltes Glas (vgl. z. B. E. T. Maggio "Enzyme Immunoassay" CAC. Press, Florida (1980), insbesondere Seiten 175—178, EP-A-0 63 064, Bioengineering 16 (1974), 997—1003, C. J. Senderson und D. V. Wilson, Immunol. gy 20 (1971), 1061—1065). Insbesondere wird als Trägermaterial ein mit Avidin oder Streptavidin beschichtetes Trägermaterial, insbesondere Polystyrol, vorzugsweise hergestellt wie in EP-A-02 69 092, beschrieben. Der Bindepartner B enthält ebenfalls entweder Troponin T oder ein Analogon davon oder einen mit

spezifisch mit Troponin T bindefähigen monoklonalen Antikörper und ist markiert. Zur Markierung eignen sich die für die jeweilige Bestimmungsmethode üblichen Mittel. So werden bei einem Radioimmun assay Radiisotope, beispielsweise ^{57}Co zur Markierung verwendet. Für einen Enzymimmunoassay sind sämtliche hierfür üblicherweise eingesetzte Enzyme, beispielsweise Peroxidase oder β -Galactosidase geeignet. Für einen Fluoreszenz-Immunoassay sind die üblichen fluoreszierenden Gruppen als Marker brauchbar. Einzelheiten dieser verschiedenen Testmethoden und Verfahrensvarianten sind dem Fachmann bekannt. In analoger Weise wie bei der Bindung an die Festphase kann auch die Bindung der Markierung an Troponin T bzw. den Antikörper kovalent oder über ein spezifisches Bindungspaar erfolgen.

Die kovalente Bindung des Antikörpers bzw. von Troponin T an einer der o. g. Bindungspartner erfolgt nach den dem Fachmann geläufigen Methoden, beispielsweise über Carbodiimid und Hydroxysuccinimid.

Als Markierungsenzym wird vorzugsweise Peroxidase (POD) verwendet.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von Herzmuskel-Troponin T spezifisch bindefähigen polyklonalen Antikörpern, deren Kreuzreaktion mit humanem Skelettmuskel-Troponin T weniger als 5% und mit Troponin I weniger als 2% beträgt. Das Verfahren besteht darin, daß man Versuchstiere, vorzugsweise Schafe, mit humanem Herzmuskel-Troponin T, in Kombination mit einem Adjuvans, über mehrere Monate (vorzugsweise 4—6 Monate) mit mindestens vier Immunisierungen in vier- bis sechswöchigem Abstand immunisiert, Rohserum gewinnt und dieses immunsorptiv reinigt.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von mit Herzmuskel-Troponin T spezifisch bindefähigen monoklonalen Antikörpern deren Kreuzreaktion mit humanem Skelettmuskel-Troponin T weniger als 5% und mit Troponin I weniger als 2% beträgt. Das Verfahren besteht darin, daß man Versuchstiere, vorzugsweise Inzuchtmäuse, mit humanem Herzmuskel-Troponin T, in Kombination mit einem Adjuvans über mehrere Monate mit mindestens vier Immunisierungen in vier- bis sechswöchigem Abstand intraperitoneal immunisiert, B-Lymphozyten gewinnt, mit einer permanenten Myelomzelllinie fusioniert, die Klone isoliert und hieraus die Antikörper gewinnt.

Bevorzugt wird als Adjuvans Aluminiumhydroxid zusammen mit Bordatella pertussis oder Freund'schem Adjuvans eingesetzt.

Die bei der Fusionierung nach dem bekannten Verfahren von Köhler und Milstein (Nature 256 (1975), 495—497) gewonnenen Primärkulturen von Hybridzellen werden in üblicher Weise, z. B. unter Verwendung eines handelsüblichen Zellsorters oder durch "Limiting Delution" kloniert. Es werden jeweils die Kulturen weiterverarbeitet, die positiv gegenüber isoliertem Herzmuskel-Troponin T und gegenüber Herzmuskel-Troponin T im Patientenserum reagieren und negativ mit Troponin T aus Skelettmuskel reagieren. Man erhält aus diese Weise Hybridoma-Zelllinien, die die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper produzieren. Nach bekannten Methoden können diese Zelllinien kultiviert und die von ihnen produzierten monoklonalen Antikörper isoliert werden.

Beispiele für die auf diese Weise gewonnenen Hybridoma-Zelllinien sind Klon 7.1 A 12.2-22 (ECACC 89060901) und Klon 8.1 F 6.7-2 (ECACC 89030308). Die

DE 39 22 873 A1

5

Zelllinien sind unter der jeweils angegebenen Nummer bei der European Collection of Animal Cellcultures, GB, hinterlegt.

Die so gewonnenen polyklonalen oder monoklonalen Antikörper zeichnen sich durch eine geringe Kreuzreaktivität gegenüber humanem Skelettmuskel-Troponin T aus, die unter 5%, vorzugsweise unter 2% liegt und durch eine Kreuzreaktivität gegenüber Troponin I von unter 2%.

Die erfindungsgemäßen polyklonalen und monoklonalen Antikörper eignen sich hervorragend dazu, in einer Probe, beispielsweise Serum oder Plasma, Herzmuskelnikrosomen spezifisch zu bestimmen. Für diese Bestimmungsverfahren können die Antikörper als solche, als chimäre Antikörper oder Fragmente hiervon, welche die entsprechenden immunologischen Eigenschaften aufweisen, beispielsweise als Fab-Fragmente, verwendet werden. Unter dem Begriff Antikörper werden daher sowohl vollständige Antikörper als auch Fragmente davon verstanden.

Die nachfolgenden Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern, ohne sie darauf zu beschränken. Prozentangaben beziehen sich auf Gew.-%.

Beispiel 1

Isolierung von Troponin T

Puffer 1:

0,05 mol/l Tris/HCl, pH 7,0
0,05 mol/l KCl
10 ml/l Triton X 100
2 mmol/l EDTA
0,5 mmol/l DTT (Dithiothreitol)
0,02% Natriumazid
2 mmol/l PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)
5 mmol/l ϵ -Aminocapronsäure
2,5 ml Trasylol/l
0,2 mg Pepstatin/l

Puffer 2:

0,05 mol/l Tris/HCl, pH 7,0
1 mol/l KCl
5 mol/l Harnstoff
2 mmol/l EDTA
0,02% Natriumazid (w/v)

Puffer 3:

5 mmol/l Kaliumphosphat, pH 7,3
2 mol/l Harnstoff
0,6 mol/l KCl
0,5 mmol/l DTT
0,02% Natriumazid (w/v)

Puffer 4:

0,05 mol/l Tris/HCl, pH 7,8
6 mol/l Harnstoff
0,01 mol/l NaCl
2 mmol/l EDTA
0,5 mmol/l DTT
0,02% Natriumazid (w/v)

300 g Gewebe (Linker Ventrikel ohne Klappen und Gefäße) wird kleingeschnitten und in dem fünffachen

6

Volumen Puffer 1 bei 4°C im Mixer maximal 1 Minute in Intervallen homogenisiert. Der nichtlösliche Anteil wird bei 27 500 g und 4°C über 15 min abzentrifugiert und das Pellet solange mit 1 l Puffer 1 gewaschen bis der Überstand völlig klar ist.

Das Pellet wird in 5–6fachem Volumen Puffer 2 aufgenommen und 3–4 Stunden bei 4°C gerührt. Es wird bei 27 500 g und 4°C 15 min zentrifugiert.

Der Überstand wird mit 5 mmol/l ATP versetzt (Endkonzentration nach Ammonsulfatzugabe) und durch Zugabe von bei 4°C gesättigter Ammonsulfatlösung/2 mmol/l EDTA auf 35% Ammonsulfat gebracht, wobei die Ammonsulfatlösung vorher mit KOH neutralisiert wird. Es wird über Nacht bei 4°C und leichtem Rühren inkubiert. Anschließend wird der Niederschlag bei 27 500 g und 4°C 20 min abzentrifugiert.

Der Überstand wird durch Zugabe von festem Ammonsulfat auf 45% Ammonsulfat-Sättigung gebracht, 45 min bei 4°C gerührt und abzentrifugiert. Die 35–45% Ammonsulfatfällung enthält Troponin T und wird weiterverarbeitet. Das Pellet wird in 25 ml Puffer 3 aufgenommen (OD 280 nm soll zwischen 1,5 und 2 liegen) und gegen Puffer 3 bei 4°C bei mindestens zweimaligem Pufferwechsel dialysiert.

Die dialysierte Lösung wird auf eine Hydroxylapatitsäule (Biogel HTP, Beladung ca. 25 mg Protein/50 ml Säulenvolumen, Fluß 1 Säulenvolumen/Stunde) aufgetragen, mit 4–5 Säulenvolumen Puffer 3 nachgewaschen und mit einem Gradienten von 5 mmol/l bis 55 mol/l Kaliumphosphat in Puffer 3 innerhalb von 20 Stunden bei einem Säulenvolumen/Stunde eluiert. Die Fraktionen, die Troponin-T enthalten, werden mittels SDS-Page (Gradientengel 5–25%) ermittelt, gepoolt und gegen Puffer 4 dialysiert.

Die dialysierte Lösung wird auf eine Säule (DEAE-Servacel SS23, Säulenvolumen 20–30 ml, Fluß 1 Säulenvolumen/Stunde) aufgegeben, mit 3 Säulenvolumen Puffer 4 nachgewaschen und mit einem Gradienten von 0,01 mol/l bis 0,25 mol/l NaCl in Puffer 4, innerhalb 20 Stunden bei 1 Säulenvolumen/Stunde eluiert. Troponin T erscheint im Durchlauf. Troponin T und Troponin C eluieren getrennt. Die Troponin-T-haltigen Fraktionen werden nach SDS-page gepoolt, gegen Puffer 4 umdialysiert und zur weiteren Verwendung bei –20°C tiefgefroren. Aus 300 g Muskel werden ca. 6–8 mg Troponin T erhalten.

Beispiel 2

50 Gewinnung von monoklonalen Antikörpern gegen humanes Troponin-T

Balb/c-Mäuse, 8–12 Wochen alt, werden mit 100 ug Troponin T (isoliert aus humanem Herzmuskel nach Beispiel 1), mit komplettem Freund-schen Adjuvans, intraperitoneal immunisiert. Nach 6 Wochen werden drei weitere Immunisierungen in 4wöchigem Abstand durchgeführt. Dabei werden jeweils 50 ug Troponin T, an Aluminiumhydroxid und Bordetella pertussis adsorbiert, intraperitoneal verabreicht.

Eine Woche nach der letzten Immunisierung erfolgt eine Blutabnahme und die Bestimmung des Antikörpertiter im Serum der Versuchstiere.

Bei positivem Verlauf der Immunisierung wird fusioniert. Vier Tage, drei Tage und zwei Tage vor der Fusionierung wird jeweils noch einmal mit 100 ug Troponin T in PBS (= phosphat buffered saline) intravenös immunisiert.

DE 39 22 873 A1

7

Zur Fusion werden in Anlehnung an Galfre, (Methods in Enzymology, 73, 1981, S. 3) 1×10^8 Milzzellen einer immunisierten Maus mit 2×10^7 Myelomzellen (P3 \times 63Ag8-653, ATCC-CRL 8375) gemischt und anschließend 10 Minuten zentrifugiert (300 g, 4°C). Die Zellen werden mit serumfreiem Kulturmedium gewaschen und bei 400 g erneut zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und das Zellsediment wird mit 1 ml 50%iger PEG-Lösung (MG 4000, Fa. Merck) versetzt. Danach wird bei Raumtemperatur mit RPMI 1640-Medium (RPMI = Rosewell Parker Memory Institut) ohne fötalem Kälberserum (FKS), langsam ausverdünt (20 ml in 15 Minuten). Die Zellsuspension wird anschließend 10 Minuten bei 400 g zentrifugiert und das Zellsediment in Selektionsmedium aufgenommen (RPMI 1640, 10% FKS, Hypoxanthin 100 mmol/l, Azaserin 1 µg/ml). An Wachstumsfaktoren wird HECS (Human Endothelial Culture Supernatant) als Feederzellersatz verwendet (Fa. Costar, No. 6110).

Die fusionierten Zellen werden 5×10^4 Zellen pro Vertiefung in 24-well Platten (Fa. Nunc) ausplattiert. Nach 7–10 Tagen ist Klonwachstum sichtbar. Der Kulturüberstand der Primärkulturen wird nach einem in Beispiel 3 beschriebenen ELISA-Verfahren getestet. Die Primärkulturen, die Antigen-spezifische Antikörper enthalten, werden mit Hilfe eines fluoreszenzaktivierenden Zellsorters auf 96-well Zellkulturplatten (Fa. Nunc) weiter kloniert. Als Feederzellersatz wird HECS (siehe oben) eingesetzt.

Auf diese Weise konnten die beiden Hybridoma-Zelllinien Klon 7.1A122-22 und 8.1F6.7-2 isoliert werden, die bei der Hinterlegungsstelle ECACC (European Collection of Animal Cell Cultures) unter den Hinterlegungsnummern

ECACC 89060901 (= Klon 7.1A122-22) und
ECACC 89030308 (= Klon 8.1F6.7-2)

hinterlegt worden sind.

Zur Erzeugung von Aszites werden 5×10^6 Hybridomzellen intraperitoneal in Balb/c Mäuse gespritzt, die zuvor 1–2mal mit 0,5 ml Pristan vorbehandelt worden sind. Nach 2–3 Wochen kann aus dem Bauchraum der Mäuse Ascites-Flüssigkeit gewonnen werden. Hieraus können in üblicher Weise die Antikörper isoliert werden. Diese monoklonalen Antikörper sind spezifisch gegen humanes Herzmuskel-Troponin T gerichtet und zeigen keine bzw. nur geringe Kreuzreaktivität mit Skelettmuskel-Troponin T. Sie werden im folgenden mit MAK 7.1A122-22 (von Klon 7.1A122-22) bzw. MAK 8.1F6.7-2 (von Klon 8.1F6.7-2) bezeichnet.

Die beiden monoklonalen Antikörper gehören der Subklasse IgG1/kappa an.

Beispiel 3

Screening-Test auf Antikörper gegen humanes Herzmuskel-Troponin-T

Um die Anwesenheit und Spezifität von Antikörpern gegen Troponin T im Serum immunisierter Mäuse, im Kulturüberstand der Hybridzellen, oder in Aszitesflüssigkeit zu erkennen, wird ein ELISA-Verfahren als Testprinzip verwendet:

Mikrotiterplatten werden mit 10 µg/ml polyklonalem Antikörper (IgG) gegen humanes Troponin T aus Schaf (immunsorptiv gereinigt, keine Kreuzreaktivität mit Skelettmuskel-Troponin T, Kreuzreaktion mit Herz-

8

muskel-Troponin T, Herstellung nach Beispiel 7) in Beschichtungspuffer (0,2 mol/l Natriumcarbonat/-Bicarbonat, pH 9,3–9,5) 1 Stunde bei Raumtemperatur beschichtet. Die Nachbeschichtung erfolgt mit 0,9% Natriumchloridlösung und 1% Rinderserumalbumin für 20 Minuten. Anschließend wird mit Waschpuffer gewaschen (0,9% Natriumchloridlösung). Die Inkubation des Antigens, humanes gereinigtes Troponin T 1 µg/ml bzw. "natives" Troponin T d. h. Infarktserum (1 : 2 verdünnt), erfolgt mit 100 µl pro well bei Raumtemperatur, 1 Stunde unter Schütteln. Dann wird erneut zweimal mit Waschpuffer gewaschen. Die Probeninkubation erfolgt mit 100 µl pro well, 1 Stunde, bei Raumtemperatur, unter Schütteln. Dann wird erneut zweimal mit Waschlösung gewaschen. Dann erfolgt eine weitere Inkubation mit 25 mU eines PAK < M-Fcg > S-FAB(IS)-Peroxidase-konjugates, 100 µl pro well, für 1 Stunde bei Raumtemperatur unter Schütteln. (PAK < M-Fcg > FAB(IS) = Fab-Fragment eines polyklonalen anti-Maus Fc-γ-Antikörpers aus Schaf, der immunsorptiv gereinigt ist.) Nach einem Waschschriff mit Waschpuffer wird die Peroxidaseaktivität in üblicher Weise bestimmt (beispielsweise mit ABTS 30 Minuten bei Raumtemperatur, abgelesen wird die Extinktionsdifferenz in mE, bei 405 nm).

Beispiel 4

Bestimmung der Kreuzreaktivität mit humanem Skelettmuskel-Troponin T

Es wird, wie in Beispiel 3 beschrieben, vorgegangen. Zunächst wird die Reaktivität von Herzmuskel-Troponin T bestimmt. Dann wird zu dem jeweiligen monoklonalen Antikörper das auf Kreuzreaktion zu prüfende Antigen (Skelettmuskel-Troponin T) in steigenden Konzentrationen zugegeben.

Die Kreuzreaktionen werden anschließend nach folgender Formel berechnet:

$$C(\text{Herzmuskel-Troponin T}) \times 100 = \% \text{Kreuzreaktion} \\ C(\text{Skelettmuskel-Troponin T})$$

C = Konzentration des Antigens, die zur Erreichung von 50% des maximalen Signals erforderlich ist.

Beispiel 5

Bestimmung der Epitopspezifität

Eine Mikrotiterplatte wird mit 10 µg/ml polyklonalem Schaf-Antikörper gegen die Fcg-Region eines Maus-Antikörpers in 0,2 mmol/l Carbonatpuffer, pH 9,6, 1 Std. bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C beschichtet. Danach wird mit Inkubationspuffer (0,9% Natriumchloridlösung und 1% Rinderserumalbumin) 20 Minuten nachbeschichtet und dann mit Waschpuffer gewaschen (0,9% Natriumchloridlösung, 0,05% Tween 20). Anschließend werden 100 µl eines monoklonalen Antikörpers (MAK 7.1A122-22, MAK 1) 10 µg/ml in Inkubationspuffer (0,9% Natriumchloridlösung mit 1% Rinderserumalbumin) zugegeben und 1 Stunde bei Raumtemperatur, unter Schütteln inkubiert.

Ein zweiter monoklonaler Antikörper (MAK 8.1F6.7-2, MAK 2), der als Peroxidase-Konjugat vorliegt, wird in Lösung (100 mU/ml) bei Raumtemperatur mit dem Antigen (Herzmuskel-Troponin-T) 1 µg/ml, eine Stunde vorinkubiert.

DE 39 22 873 A1

9

Nach der Inkubation der Platte mit MAK 1 wird überschüssiger Antikörper durch Waschen entfernt. Die Platte wird anschließend mit 1% Maus-Normalserum in Inkubationspuffer nachbeschichtet. 100 µl des vorinkubierten Troponin T/MAK 2-Peroxidase-Komplexes wird auf die Platte gegeben und 1 Stunde, bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Die gebundene Peroxidase-Aktivität wird mit ABTS als Substrat sichtbar gemacht. Erkennt der MAK 2 das gleiche bzw. ein überlappendes Epitop wie MAK 1, so kommt es zu keiner Paarungsbildung zwischen MAK 1/Troponin T/MAK 2 und somit zu Substratreaktion. Die gefundenen Ergebnisse zeigen, daß die beiden monoklonalen Antikörper 7.1A122-22 und 8.1F6.7-2 gegen verschiedene Epitope des Antigens Herzmuskel-Troponin-T gerichtet sind.

Beispiel 6

Enzym-Immunoassay zur Bestimmung von Troponin T nach dem ELISA-Prinzip

Reagenz 1

1,25 µg/ml biotinylierter MAK 7.1A122-22 (Herstellung analog J. H. Peters et al., Monoklonale Antikörper, Springer Verlag, Berlin, 1985, Seiten 209–212.)
10 mmol/l Citratpuffer
47 mmol/l Phosphatpuffer, pH 6,3
50 mU/ml Konjugat aus Peroxidase und monoklonalem Antikörper 8.1F6.7-2 (hergestellt analog M. B. Wilson, P. K. Nakane (1978) in Immunofluorescence and Related Staining Techniques (W. Knapp, K. Kolubar, G. Wick eds.) pp. 215–224, Elsevier/North Holland, Amsterdam, die Aktivitätsangabe bezieht sich auf Peroxidase).

Reagenz 2

100 mmol/l Phosphat-Citratpuffer, pH 4,4
3,2 mmol/l Natriumperborat
1,9 mmol/l ABTS (2,2'-Azino-di-[3-ethyl-benzthiazolin-sulfonat(6)])

Als Probe werden Humanserum verwendet, die mit 3, 5, 10 bzw. 25 ng/ml Troponin T aufgestockt sind.

Die Reaktion wird durchgeführt mit streptavidinbeschichteten Polystyrolröhrchen (Herstellung nach EP-A-02 69 092).

Durchführung der Bestimmung

0,2 ml Probe werden mit 1 ml Reagenz 1 60 min bei 20–25°C in einem Röhrchen inkubiert. Es wird ausgesaugt und zweimal mit Leitungswasser gewaschen. Anschließend wird Reagenz 2 zugegeben, 30 min bei 20–25°C inkubiert und bei 420 nm im Photometer die Extinktion bestimmt.

Auf diese Weise wird eine Standardkurve (Abb. 1) erhalten, über die die Troponin T-Konzentrationen von Patientenproben bestimmt werden können.

Beispiel 7

Gewinnung und Reinigung von polyklonalen Antikörpern gegen Troponin T

Schafe werden mit 55 µl einer Lösung von 0,1 mg/ml humanem Troponin T in komplettem Freundschem Ad-

10

juvans (CFA) erstimmunisiert. Weitere Immunisierungen erfolgen am 7., 14. und 30. Tag. Im weiteren wurde alle 30 Tage immunisiert. Bei diesen Folgeinjektionen wurden jeweils 28 µl einer Troponin T-Lösung von 0,05 mg/ml in CFA verwendet. Nach sechs Monaten wird das Rohserum gewonnen.

1 l Rohserum wird mit 15 g Aerosil (Hersteller: Degussa) versetzt, 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt und zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand mit 1,7 mol/l Ammonsulfat versetzt und 2 Stunden bei Raumtemperatur langsam gerührt. Anschließend wird der Niederschlag abzentrifugiert und in 0,2 l Dialysepuffer (15 mmol/l Kaliumphosphat, 50 mmol/l Natriumchlorid, pH 7,0) homogenisiert und bei 4°C gegen 4 × 10 l Dialysepuffer dialysiert. Nach erneuter Zentrifugation wird das dialysierte Produkt über DE 52-Cellulose, unter Elution mit Dialysepuffer, gereinigt.

Das Eluat wird auf 50 mmol/l Kaliumphosphat, pH 7,5, 150 mmol/l Natriumchlorid (PBS), 0,1% Azid aufgestockt und mit einer Konzentration von ca. 15 mg/ml Protein bei Raumtemperatur über eine Troponin T-Immunadsorbens-Säule gegeben und mit PBS/0,1% Azid proteinfrei gewaschen. Anschließend wird mit 1 mol/l Propionsäure eluiert.

Die Herstellung des Troponin T-Immunadsorbers erfolgt dadurch, daß mit 15%iger Salpetersäure und H₂O gewaschenes Spherosil (Rhone Poulenc XOC005) nach Trocknen mit 10% (v/v) 3-(Triethoxysilyl)propylamin in DMSO bei 85°C über Nacht zu Spherosil-NH₂ umgesetzt wird. Nach der Umsetzung wird mit DMSO und Isopropanol gewaschen und das Adsorbens bei 50°C getrocknet.

Spherosil-NH₂ wird mit 10%iger Glutaraldehyd-Lösung, pH 3,7, vermischt und bei 55°C 2 Stunden erwärmt. Die Suspension wird anschließend unter Vakuum über einen Glasfilter abgesaugt. Dann wird mit dem siebenfachen Spherosilvolumen an destilliertem Wasser gewaschen und mit dem fünffachen Volumen an 10 mmol/l Kaliumphosphat, pH 8,0/0,1 mol/l Natriumchlorid nachgewaschen. 10 mg Troponin T werden pro ml Spherosil in 10 mmol/l Kaliumphosphat, pH 8,0/0,1 mol/l Natriumchlorid in ca. 50% des eingesetzten Spherosil-Volumens in einem Rundkolben zugegeben. Der Kolben wird über Nacht bei Raumtemperatur am Rotationsverdampfer rotiert.

Nach Filtration wird das Spherosil mehrfach mit 0,9%iger NaCl-Lösung sowie Äthanolamin-Lösung nachgewaschen. Anschließend werden 3 Volumenteile Äthanolamin-Lösung zugegeben und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach nochmaliger Filtration wird wieder mit NaCl-Lösung gewaschen. Anschließend wird der Immunadsorber mit PBS auf pH 7,5 eingestellt und mit PBS/Natriumazid äquilibriert. Die Lagerung erfolgt bei 4°C.

Beispiel 8

Bestimmung von Herzmuskelnekrosen

Es wurde mit Serum von 37 Patienten mit instabiler Angina pectoris-Symptomatik ein Enzym-Immunoassay zur Bestimmung von Troponin T nach Beispiel 6 durchgeführt.

Bei 13 dieser Patienten (30%) konnte eine signifikante Erhöhung von Troponin T gefunden werden. Dies spricht für die deutlich höhere Sensibilität der Troponin T-Bestimmung zum Nachweis des kleinen Infarkts, verglichen mit dem Troponin I-Test.

DE 39 22 873 A1

11

Auch beim transmuralen Infarkt unterscheidet sich die Serumkonzentrationskurve von Troponin T signifikant von der von Troponin I. Zwar kann bei einzelnen Patienten ein phasischer Verlauf der Troponin T-Freisetzung beobachtet werden, jedoch war dieser phasenhafte Verlauf typischerweise nicht, wie für Troponin I, zweiphasig sondern dreiphasig (Fig. 2). Die mittlere Serumkonzentrationskurve bei 52 Patienten mit transmuralen Infarkt unterscheidet sich ebenfalls signifikant von der von Troponin I. So wird Troponin I in dieser Infarktgruppe (transmuraler Infarkt) im Mittel länger als 300 Stunden nach Schmerzbeginn erhöht gefunden (Fig. 3). Das Zeitintervall absoluter diagnostischer Sensitivität erstreckt sich von der 6. bis zur 195. Stunde.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung von Herzmuskelnekrosen nach dem Prinzip des Immunoassays, dadurch gekennzeichnet, daß eine Serum- oder Plasmaprobe mit mindestens einem Antikörper gegen Troponin T und einem Bindepartner B für Troponin T oder für den Antikörper inkubiert wird, wobei entweder der Antikörper gegen Troponin T oder der Bindepartner B mit einer bestimmbaren Gruppe markiert ist, der dabei gebildete immunologische Komplex, der die bestimmbare Gruppe enthält, abgetrennt und die bestimmbare Gruppe in der abgetrennten oder noch verbliebenen Phase als Maß für Troponin T aus der Probe bestimmt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Probe mit dem Antikörper gegen Troponin T und einem Konjugat aus einem Antikörper gegen Troponin T und einer bestimmbaren Gruppe inkubiert wird, der gebildete immunologische Komplex durch Phasentrennung abgetrennt und die bestimmbare Gruppe in einer der Phasen bestimmt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Probe mit einem Antikörper gegen Troponin T und einem Konjugat aus Troponin T und einer bestimmbaren Gruppe inkubiert wird, der gebildete immunologische Komplex durch Phasentrennung abgetrennt und die bestimmbare Gruppe in einer der Phasen bestimmt wird.
4. Verwendung von Antikörpern gegen Troponin T zur Bestimmung von Herzmuskelnekrosen.
5. Monoklonale oder polyklonale Antikörper gegen Troponin T mit einer Kreuzreaktivität gegen Troponin I von <2% gegenüber Skelettmuskel-Troponin T von <5%.
6. Hybridoma-Zelllinien ECACC 89060901 und ECACC 89030308.
7. Monoklonale Antikörper hergestellt unter Verwendung der Hybridoma-Zelllinien ECACC 89060901 und ECACC 89030308.
8. Verfahren zur Herstellung von polyklonalen Antikörpern gegen Troponin T mit einer Kreuzreaktivität gegen Troponin I von <2% gegenüber Skelettmuskel-Troponin T von <5% durch Immunisierung von Versuchstieren mit humanem Skelettmuskel-Troponin T in Kombination mit einem Adjuvans über mehrere Monate mit mindestens 4 Immunisierungen in vier- bis sechswöchigem Abstand immunisiert, Rohserum gewinnt und dieses immunosorptiv reinigt.
9. Verfahren zur Herstellung von monoklonalen

12

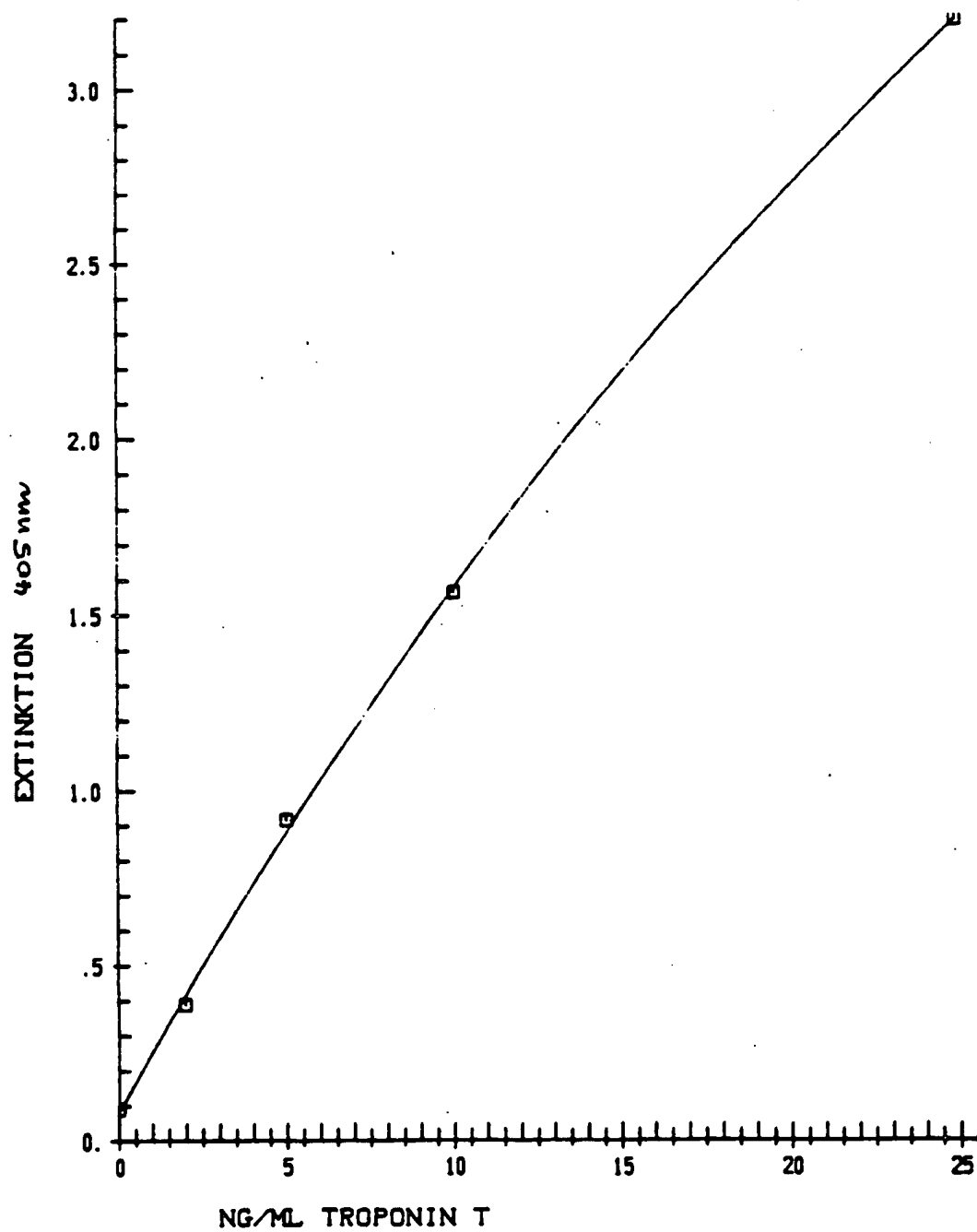
Antikörpern gegen Troponin T mit einer Kreuzreaktivität gegen Troponin I von <2% gegenüber Skelettmuskel-Troponin T von <5% durch Immunisierung von Versuchstieren mit humanem Skelettmuskel-Troponin T in Kombination mit einem Adjuvans über mehrere Monate mit mindestens 4 Immunisierungen in vier- bis sechswöchigem Abstand immunisiert, B-Lymphozyten gewinnt, diese mit einer permanenten Myelomzelllinie fusioniert, die Klone isoliert und hieraus die Antikörper gewinnt.

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

ZEICHNUNGEN SEITE 1

Nummer: DE 39 22 873 A1
Int. Cl.⁵: C 12 N 5/24
Offenlegungstag: 31. Okt. ber 1990

Fig. 1



ZEICHNUNGEN SEITE 2

Nummer:

DE 39 22 873 A1

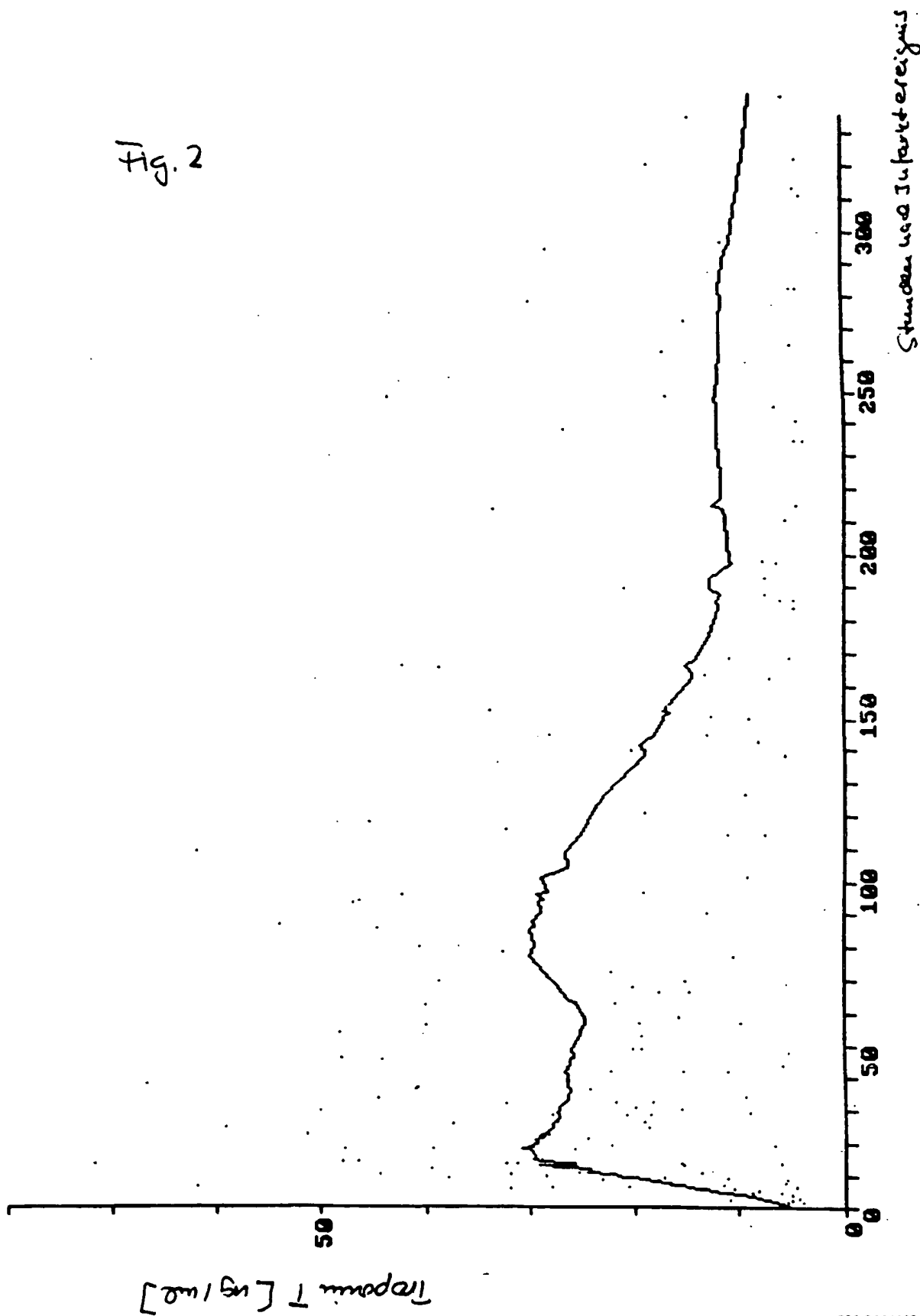
Int. Cl.⁵:

C 12 N 5/24

Offenlegungstag:

31. Oktober 1990

Fig. 2



008 044/443

ZEICHNUNGEN SEITE 3

Nummer:

DE 39 22 873 A1

Int. Cl. 5:

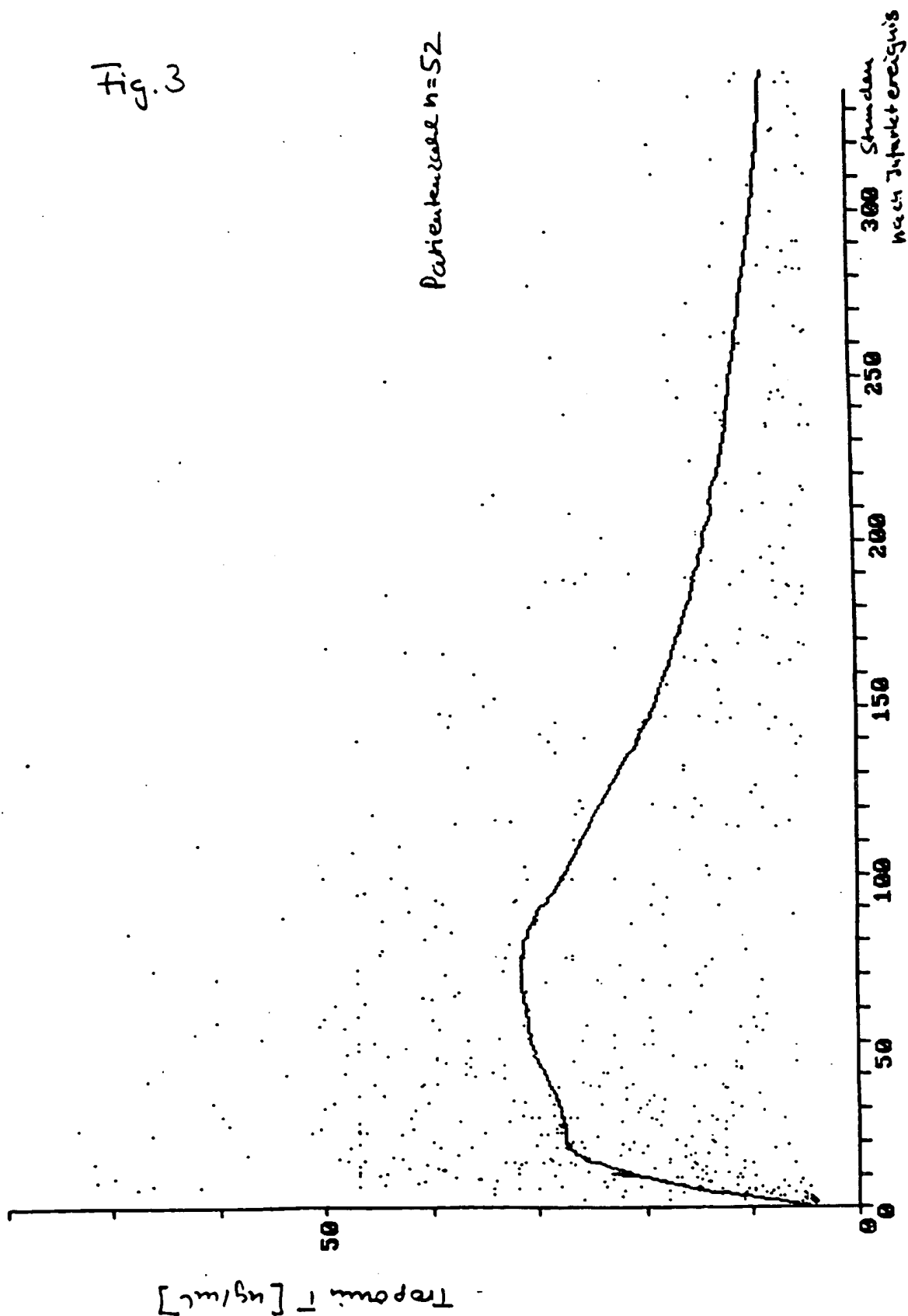
C 12 N 5/24

Offenlegungstag:

31. Oktober 1990

Fig. 3

Patientenwahl n=52



008 044/443